

Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik Dari Saluran Pembuangan Limbah Industri Tahu

Isolation and Characterization of Proteolytic Bacteria From Industrial Waste Sewer of Tofu

Andri Nindya Karina⁽¹⁾, Dirayah Rauf Hussain⁽¹⁾, Eva Johannes⁽¹⁾ dan Nur Haedar Nawir ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Email : karinaandri@gmail.com

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian “**Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik Dari Saluran Pembuangan Limbah Industri Tahu**”. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri proteolitik dari saluran pembuangan limbah industri tahu dan mengetahui karakter serta kemampuan aktivitas proteolitik sebagai penghasil enzim protease. Isolasi bakteri proteolitik menggunakan medium SMA (*Skim Milk Agar*). Pengamatan karakter isolat bakteri proteolitik terlebih dahulu dilakukan, seleksi isolat bakteri, dan selanjutnya pengamatan morfologi koloni, pengecatan gram, dan pewarnaan spora. Hasil seleksi isolat bakteri proteolitik menunjukkan terdapatnya 7 isolat bakteri yang dapat menghasilkan zona *halo* dan terdapat dua isolat bakteri tersebut yang memiliki nilai Indeks Proteolitik tertinggi. Pengamatan morfologi bertujuan untuk menunjukkan adanya variasi warna, bentuk, tepi dan elevasi dari setiap isolat. Hasil pengecatan mikroskopis menunjukkan terdapat 2 isolat bakteri bersifat gram positif dan memiliki bentuk sel berbentuk batang dan tidak memiliki endospora. Hasil pertumbuhan bakteri menunjukkan 2 isolat bakteri memiliki fase logaritmik dengan waktu generasi yang berbeda yang masing-masing isolat A1 = 240 menit dan isolat A4 = 168 menit. Pengujian aktivitas proteolitik menunjukkan 2 isolat bakteri menghasilkan nilai aktivitas enzim berbeda yaitu isolat A1 sebesar 0,0044 U/mL dan isolat bakteri A4 sebesar 0,1498 U/mL.

Kata Kunci : Isolasi, Karakterisasi, Bakteri Proteolitik, Limbah Industri Tahu.

ABSTRACT

The research have done about “**Isolation and Characterization of Proteolytic Bacteria From Industrial Waste Sewer of Tofu**”. The research has objective to obtain proteolytic bacteria from sewage with industrial of tofu and know that character along with ability of proteolytic activity as produce protease enzymes. Isolation of proteolytic bacteria using by *Skim Milk Agar* medium. Observations character of proteolytic bacteria, beforehand do the selection of bacterial isolats, and then observing of colony morphology, gram staining, and spores staining. The result of Selection proteolytic bacteria isolats showed seven isolats that produce halo zone and there are two bacterial isolats that have the highest value proteolytic index. Morphological observation aims to show the variation of color, shape, edge and elevation of each isolat. The results of microscopic staining showed that there were two isolatd bacteria are gram-positive and has has the shape of stem cells and didn't had endospores. The results showed two isolats have logarithmic phase and a different generation on the bacterial growth that is A1 = 240 minute and A4 = 168 minute. Proteolytic activity test showed two isolats different value of produce enzyme activity that is A1 as much as 0,0044 U/mL and A4 isolats much as 0,1498 U/mL.

KEYWORDS :Isolation, Characterization, Proteolytic Bacteria, Industrial Waste of Tofu.

Latar Belakang

Indonesia termasuk negara yang masyarakatnya menyukai mengkonsumsi tahu, sehingga terdapat banyak industri tahu yang dapat dijumpai di setiap daerah. Proses produksi industri tahu dilakukan secara tradisional dan hasil sampingnya berupa limbah. Bahan-bahan organik yang terkandung di dalam air buangan industri tahu pada umumnya sangat tinggi. Karakteristik limbah cair tahu secara fisika meliputi padatan total, suhu, warna dan bau sedangkan secara kimia meliputi bahan organik, bahan anorganik dan gas. Senyawa-senyawa organik di dalam air buangan tersebut berupa protein (40-60%), karbohidrat (25-60%), dan lemak (10%), konsentrasi *Chemical Oxygen Demand* (COD) 400-1400 ppm, pH 4-5, *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) 3000-4000 mg/L (Wahjono dan Said, 1999).

Industri tahu menghasilkan dua macam limbah yaitu limbah padat dan limbah cair. Limbah padat berupa ampas tahu yang diperoleh pada saat ekstraksi susu kedelai (penyaringan), sedangkan limbah cair dihasilkan setelah koagulasi protein susu kedelai dan pada saat proses pengepresan atau pencetakan tahu. Limbah cair tahu mengandung 9% protein, 0.69% lemak, dan 0.05% karbohidrat (Triyono dan Hasanudin, 1998).

Kandungan protein yang tinggi menyebabkan mikroorganisme dalam limbah sangat berlimpah dan juga berpotensi untuk menjadi media tumbuh bakteri sangatlah besar. Mikroorganisme tersebut menggunakan oksigen untuk mengoksidasi bahan organik menjadi energi sehingga lambat laun kadar oksigen terlarut dalam perairan berkurang dan nilai BOD meningkat. Jika oksigen terlarut habis, maka proses perombakan bahan organik akan berlangsung dalam kondisi anaerob. Proses ini menghasilkan senyawa-senyawa yang selain berbau busuk juga bersifat racun bagi hewan dan manusia (Wardani dan Nindita, 2012).

Sebagian besar industri tahu mengalirkan langsung limbahnya ke saluran-saluran pembuangan sehingga limbah cair yang dikeluarkan seringkali menjadi masalah bagi kesehatan dan lingkungan sekitar apabila tanpa pengelolaan terlebih dahulu (Fatoni, dkk., 2008).

Mengatasi permasalahan pembuangan limbah pada saluran pembuangan, diupayakan suatu metode terutama penggunaan mikroorganisme seperti bakteri yang memiliki kemampuan dalam

mendegradasi bahan organik. Menurut Zahida dan Shovitri (2013) beberapa bakteri tersebut dapat ditemukan pada lingkungan yang memiliki kandungan bahan organik yang tinggi seperti pada saluran pembuangan limbah industri tahu. Bakteri yang tumbuh pada limbah tersebut tentunya tidak semuanya memberikan dampak negatif, namun juga beberapa diantaranya memberikan dampak positif yang memungkinkan dapat dimanfaatkan untuk kemaslahatan manusia maupun dimanfaatkan untuk industri.

Menurut Droste (1997) bahan organik yang merupakan sumber bahan pencemar kualitas air umumnya adalah bahan organik yang terdiri dari protein, lemak dan karbohidrat seperti yang terdapat pada limbah tahu sehingga dalam pendegradasian bahan organik tersebut diperlukan adanya bakteri dari golongan bakteri proteolitik, bakteri lipolitik dan bakteri amilolitik.

Secara sederhana, bakteri proteolitik merupakan mikroorganisme yang memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel (Pastor *et al*, 2001; Ward, 1985).

Menurut penelitian dari Yusriah dan Kuswytasari (2013) beberapa bakteri proteolitik yang menghasilkan enzim protease digunakan dalam skala industri terutama digunakan dalam industri detergen, farmasi, produk-produk kulit, pengempukan daging, hidrolisat protein, produk-produk makanan, maupun pengolahan limbah industri. Penggunaan mikroorganisme sebagai penghasil enzim juga merupakan salah satu upaya yang lebih mudah dan efisien karena pertumbuhannya yang cepat, dapat tumbuh pada substrat yang mudah didapat.

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keberadaan isolat bakteri proteolitik dalam limbah industri tahu yang berasal dari saluran pembuangan dan selanjutnya dilakukan karakterisasi untuk mengetahui sifat fisiologi dari isolat bakteri proteolitik serta kemampuan proteolitik yang dimilikinya dalam bentuk nilai indeks proteolitik dan begitupun kemampuan menghasilkan enzim protease.

Bahan dan Metode

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di Industri Pembuatan Tahu Kelurahan Karanganyer, Makassar. Pengambilan sampel limbah diambil pada saluran pembuangan industri tahu. Sampel tersebut dimasukkan dalam botol sampel steril yang berukuran 600 ml sebanyak 420 ml atau $\frac{3}{4}$ bagian dari botol sampel. Lalu dibawa ke laboratorium untuk segera dianalisis.

Isolasi Isolat Bakteri Proteolitik

Masing-masing sampel dari saluran pembuangan asal limbah industri tahu dibuatkan pengenceran bertingkat $10^{-1} - 10^{-9}$. Sampel sedimen dibuat seri pengenceran bertingkat $10^{-1} - 10^{-9}$, sedangkan sampel air dibuat seri pengenceran bertingkat $10^{-1} - 10^{-6}$. Diambil sebanyak 0,1 ml pada tiga seri pengenceran terakhir yaitu Sampel Sedimen (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) dan Sampel air (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) ke dalam cawan petri yang berisi media *Skim Milk Agar*, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 sampai 48 jam. Dilakukan beberapa kali inokulasi isolat bakteri ke media *Skim Milk Agar* hingga diperoleh isolat murni bakteri.

Pemurnian Isolat Bakteri Proteolitik

Isolat bakteri proteolitik yang memperlihatkan zona bening disekitar koloni pada isolasi isolat bakteri proteolitik dari pengenceran bertingkat diambil dengan menggunakan ose steril, kemudian digoreskan di permukaan *Skim Milk Agar*, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 sampai 48 jam. Dilakukan beberapa kali pemindahan isolat bakteri ke media *Skim Milk Agar* hingga diperoleh isolat murni bakteri. Isolat murni bakteri akan ditandai dengan karakteristik yang seragam pada semua koloni isolat dalam satu cawan petri seperti bentuk koloni, tepi koloni, warna koloni, dan permukaan koloni.

Pembuatan Stok Isolat Bakteri Proteolitik

Setelah didapatkan koloni murni dari tahap pemurnian, dibuatkan media *Skim Milk Agar* pada tabung reaksi dengan memiringkan 45° kemudian isolat bakteri proteolitik digoreskan dengan teknik gores sinambung pada permukaan media. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian

dimasukkan kedalam lemari pendingin untuk penyimpanan yang lebih lama.

Seleksi Isolat Bakteri Proteolitik

Aktivitas bakteri dalam mendegradasi protein ditunjukkan dengan adanya zona *halo* (lingkaran jernih) di sekitar koloni. Untuk mengetahui indeks proteolitik isolat bakteri dilakukan metode titik. Besarnya diameter zona bening dihitung dengan rumus:
Indeks zona bening protease

$$= \frac{\text{Diameter zona bening protease}}{\text{Diameter koloni}}$$

Isolat bakteri yang memiliki Indeks Proteolitik (IP) tertinggi akan dilanjutkan ke tahap pembuatan stok kultur dan tahap karakterisasi. Indeks Proteolitik (IP) merupakan ukuran yang menunjukkan nisbah antara diameter zona bening terhadap diameter koloni (Durham et al., 1987).

Karakterisasi Isolat Bakteri Proteolitik

a. Pengecatan Gram

Dibersihkan objek gelas dengan alkohol, kemudian difiksasi di atas nyala lampu spiritus. Setelah itu, dioleskan suspensi bakteri di atas kaca objek, kemudian difiksasi di atas lampu spiritus. Selanjutnya, ditetaskan kristal violet sebanyak 1–2 tetes selama 1 sampai 2 menit, lalu dicuci dengan aquadest, kemudian dikeringanginkan. Setelah itu, ditetaskan larutan lugol 1–2 tetes selama 1–2 menit, lalu dicuci dengan aquadest, kemudian dikeringanginkan. Selanjutnya ditetaskan alkohol 70% sebanyak 1–2 tetes selama 30 detik, lalu dicuci dengan aquadest, kemudian dikeringanginkan. Setelah itu, ditetesi safranin 1–2 tetes selama 1 sampai 2 menit, lalu dikeringanginkan, kemudian diamati di bawah mikroskop.

b. Pewarnaan Endospora

Pewarnaan spora dilakukan dengan mengambil satu ose isolat bakteri, difiksasi pada kaca objek, lalu diberikan 2–3 tetes *Malachite green*, lalu dipanasuapkan selama 5 menit (sampai uap terlihat), didiamkan selama 1 menit, bilas dengan aquadest, ditetaskan safranin dan dibiarkan selama 30 detik, lalu dikeringkan tanpa pemanasan. Setelah itu diamati dengan mikroskop, spora

berwarna hijau sedangkan bagian sel lainnya berwarna merah (Cappucinno,1983).

Pembuatan Starter Isolat Bakteri Proteolitik

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media produksi (*Bushnell Haas*) sebanyak 50 ml dan diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang selama 24 jam. Setelah 24 jam, diukur nilai *Optical Density* (OD) isolat bakteri tersebut dengan alat spektrofotometer pada $\lambda = 580$ nm, sampai didapatkan *Optical Density* (OD) sebesar 0,5.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Sebanyak 1% starter isolat bakteri diinokulasikan ke dalam 100 ml media produksi (*Bushnell Haas*) kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu kamar selama 24 jam. Isolat bakteri yang tumbuh dalam media produksi digunakan untuk pembuatan kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan mikroba dibuat bersamaan dengan proses produksi enzim. Pengambilan inokulum sebanyak 8 ml setiap 4 jam sekali, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, diukur nilai *Optical Density* (OD) bakteri tersebut dengan alat spektrofotometer pada $\lambda = 580$ nm. Nilai DO yang diperoleh diplot pada kertas semilogaritmik.

Pengukuran Aktivitas Proteolitik

Setelah mengetahui kurva pertumbuhan isolat bakteri proteolitik, isolat bakteri dari media pra-kultur diinokulasikan sebanyak 1 ml ke dalam 150 ml media produksi, kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu kamar selama 3 hari dan dilakukan pengambilan isolat bakteri pada fase logaritmik dan fase stationer. Isolat bakteri dari media produksi dimasukkan sebanyak 8 ml ke dalam tabung reaksi, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 9.000 rpm selama 15 menit

Pengukuran aktivitas proteolitik dilakukan menurut metode yang dilakukan Enggel dkk., (2004) sebanyak 0,25 ml larutan enzim ditambahkan dengan 0,25 ml larutan buffer fosfat pH 7 dan dipreinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Setelah dipreinkubasi ditambahkan 0,25 ml substrat (2% kasein dalam buffer fosfat pH 7), campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,5

ml asam trikloroasetat (TCA) 0,4 M, yang selanjutnya disentrifugasi untuk diambil supernatannya. Sebanyak 0,2 ml supernatan ditambahkan dengan 1 ml natrium karbonat 0,5 M, dipreinkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan dengan 0,2 ml reagen *Folin Ciocalteu* dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Selanjutnya, melakukan pembacaan *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 578 nm.

Hasil inkubasi diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda = 578$ nm. Aktivitas enzim proteolitik dapat dihitung dengan rumus :

$$UA = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times P \times \frac{1}{T}$$

Keterangan :

UA = Unit aktivitas enzim
Asp = Nilai absorbansi sampel
Ast = Nilai absorbansi standart
Abl = Nilai absorbansi blanko
T = Waktu inkubasi
P = faktor pengenceran

Hasil dan Pembahasan

Isolasi Bakteri Proteolitik

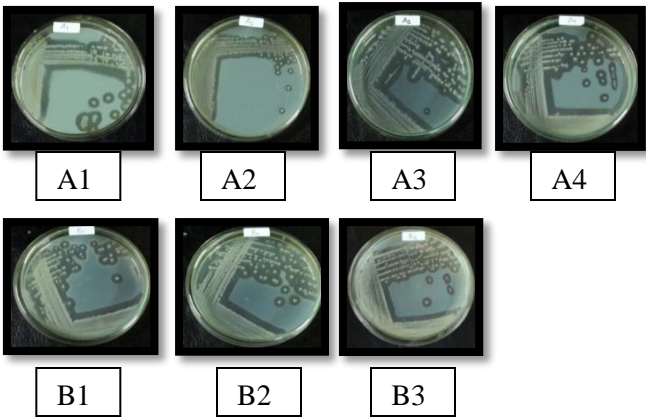
Sampel yang telah diambil dari saluran pembuangan di masukkan kedalam botol sampel. Masing-masing limbah dilakukan pengenceran bertingkat yaitu sampel sedimen $10^{-1} - 10^{-9}$ dan sampel air $10^{-1} - 10^{-6}$. Hasil pengamatan dengan mengambil masing-masing pada sampel sedimen 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} dan sampel air 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} diinokulasikan pada medium *Skim Milk Agar* (SMA) sebanyak 0,1 ml.

Hasil inokulasi bakteri yang dilakukan secara tabur diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi diperoleh koloni-koloni yang menghasilkan zona bening disekitar koloni. Koloni yang berasal dari sampel sedimen diberi **kode A** pada masing-masing cawan petri begitupun dengan sampel air diberi **kode B** pada cawan petri.

Pemurnian Isolat Bakteri Proteolitik

Berdasarkan hasil isolasi bakteri proteolitik yang ditumbuhkan pada medium *Skim Milk Agar* (SMA) diperoleh 4 isolat bakteri proteolitik dari sampel sedimen (A1, A2, A3, A4) dengan bentuk koloni yang berbeda dan diperoleh 3 isolat bakteri

proteolitik dari sampel air (B1, B2, B3). Masing-masing isolat memiliki morfologi yang berbeda dan ukuran koloni yang berbeda serta ukuran zona bening yang berbeda.



Gambar 1. Pemurnian isolat bakteri proteolitik asal sampel sedimen dan sampel air

Kemudian koloni murni terpilih digores pada stok kultur dari medium *Skim Milk Agar* yang dibuat dalam bentuk media miring untuk digunakan pada tahap karakterisasi meliputi seleksi isolat bakteri, pengamatan morfologi, pengamatan kurva pertumbuhan serta pengukuran aktivitas proteolitik dari isolat bakteri proteolitik.

Pengamatan Hasil Seleksi Isolat Bakteri Proteolitik

Isolat bakteri proteolitik yang telah memiliki koloni murni kemudian diukur zona *halo* (bening) pada masing-masing isolat bakteri proteolitik pada tahap seleksi isolat bakteri proteolitik untuk mengetahui nilai Indeks Proteolitik (IP) dari 7 isolat bakteri proteolitik terpilih.

Tabel 1. Hasil pengukuran zona halo dan zona koloni pada masing-masing isolat bakteri proteolitik.

Kode Isolat	Diameter Zona <i>halo</i>	Diameter Zona koloni	Total Indeks Proteolitik (IP)
A1	1,27	0,42	3,02
A2	0,36	0,14	2,57
A3	4,32	3,9	1,10
A4	1,19	0,41	2,90
B1	1,22	0,44	2,77
B2	1,53	1,31	1,16
B3	1,14	0,43	2,65

Pada Tabel 1 menunjukkan 2 isolat A1 dan A4 memiliki nilai IP yang tinggi (3,02 mm dan 2,90 mm). Isolat A1 memiliki diameter zona bening (*halo*) 1,27 mm dan diameter zona koloni sebesar

0,42 mm, didapatkan nilai Indeks Proteolitik (IP) sebesar 3,02 mm. Isolat A4 memiliki diameter zona bening (*halo*)sebesar 1,19 mm dan diameter zona koloni sebesar 0,41 mm. Hasil dari masing-masing kedua isolat menunjukkan bahwa diameter zona bening (*halo*) memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan ukuran diameter zona koloni

Menurut penelitian Wardani dan Nindita (2012) besarnya diameter zona bening (*halo*) yang terbentuk menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri proteolitik terpilih memiliki kemampuan dalam menghidrolisis protein dan kasein yang ada pada media *Skim Milk Agar* untuk menghasilkan aktivitas protease.

Karakterisasi Isolat Bakteri Proteolitik

a. Pengecatan Gram

Isolat bakteri proteolitik terpilih yang diperoleh pada tahap seleksi isolat bakteri berdasarkan nilai Indeks Proteolitik, kedua isolat bakteri (A1,A4) memiliki nilai IP yang tertinggi selanjutnya dilakukan tahap karakterisasi meliputi pengecatan gram dan pewarnaan endospora.

Tabel 2. Hasil Pengecatan Gram dan Endospora Isolat Bakteri

Pengamatan Morfologi sel			
Nama Isolat	Pengecatan Gram		Spora
	Bentuk	Warna	
A1	Basil	Positif	Tidak Ada
A4	Basil	Positif	Tidak Ada

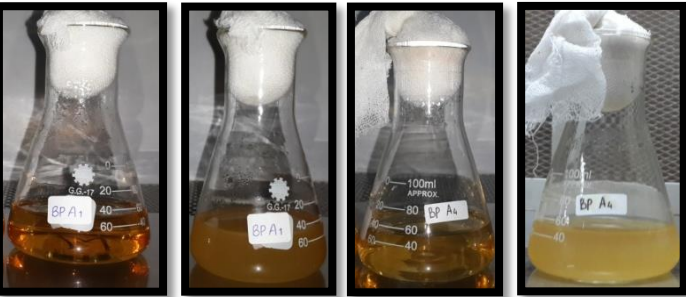
b. Pewarnaan Endospora

Hasil pengecatan endospora, isolat yang berbentuk basil (batang) dari hasil pengecatan gram kemudian dilakukan pengecatan endospora. Berdasarkan hasil pada Tabel 2 diperoleh 2 isolat (A1,A4) yang terpilih dari tahap seleksi tidak memiliki endospora. Tabel 2 menunjukkan sel bakteri yang terlihat pada mikroskop hanya terdapat sel vegetatif yang berwarna merah dan tidak terbentuk spora.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Bila bakteri diinokulasikan kedalam medium baru, pembiakan tidak segera terjadi tetapi ada periode penyesuaian pada lingkungan yang dikenal dengan pertumbuhan. Kemudian akan memperbanyak diri (replikasi) dengan laju konstan, sehingga akan diperoleh kurva pertumbuhan. Pertumbuhan yang terjadi setelah isolat bakteri (A1, A4) diinokulasikan kedalam medium produksi (*Brusnell Haas*) sebagai pra kultur dan

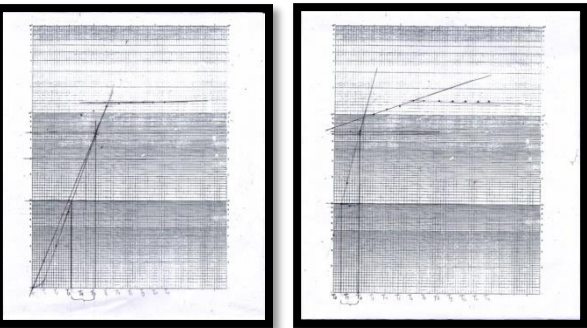
diinkubasi suhu ruang 37°C selama 24 jam memperlihatkan perubahan medium produksi dari kondisi bening berubah menjadi sangat keruh setelah 24 jam waktu inkubasi.



A1 (Si) A1 (St) A4 (Si) A4 (St)

Gambar 2. Hasil pra-kultur isolat bakteri proteolitik (A1,A4) yang diinkubasi pada suhu ruangan dengan Shaker inkubator selama 24 jam (Si = Sebelum inkubasi, St = Setelah inkubasi 24 jam)

Hasil pra-kultur pada Gambar 2 memperlihatkan sebelum diinkubasi, medium produksi berwarna bening. Kondisi media yang bening memperlihatkan bahwa didalam media belum adanya pertumbuhan bakteri sehingga diinokulasikan isolat bakteri terpilih (A1,A4) sebanyak 1 ml pada medium kultur bakteri. Pertumbuhan dapat diamati dari meningkatnya jumlah sel atau massa sel (berat kering sel) yang mengakibatkan perubahan warna pada media. Terlihat pada Gambar 10 yang terletak disebelah kanan warna medium mengalami perubahan dari bening menjadi sangat keruh setelah inkubasi selama 24 jam. Selama proses inkubasi, isolat bakteri proteolitik yang telah diinokulasikan kedalam medium produksi mengalami pertumbuhan dengan cara melakukan pembelahan sel dalam beberapa selang waktu.

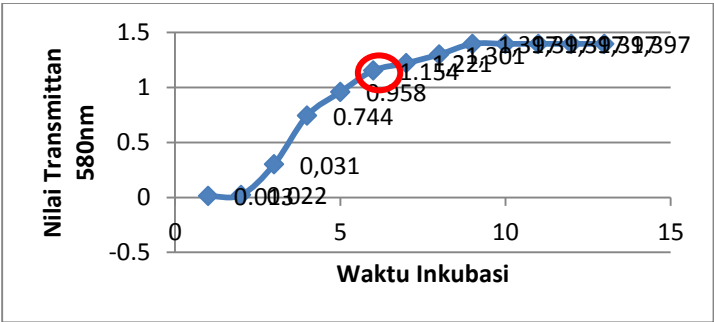


Gambar 3. Grafik pertumbuhan isolat bakteri proteolitik A1 dan A4 pada waktu inkubasi 24 jam.

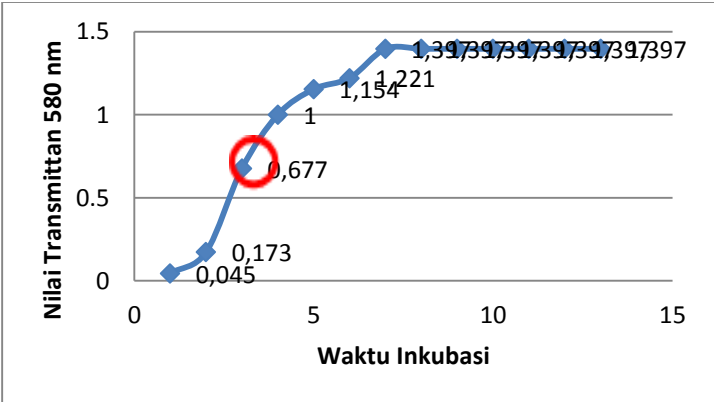
Dari profil garis grafik pertumbuhan sel bakteri tersebut, dapat dikenal fas-fase pertumbuhan populasi sel bakteri seperti fase permulaan, fase pertumbuhan dipercepat, fase logaritmik, fase pertumbuhan diperlambat, fase stasioner maksimum dan fase kematian. Fase pertumbuhan ini juga menjadi acuan untuk tahap ekstraksi enzim yang akan dilakukan pada tahap uji aktivitas proteolitik pada isolat bakteri.

Pengukuran Aktivitas Proteolitik

Pengukuran aktivitas enzim pada isolat bakteri secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui nilai unit aktivitas enzim yang dihasilkan pada kedua isolat bakteri proteolitik (A1,A4) yang ditumbuhkan pada medium *Brushnell Haas* dan diambil pada fase optimum pertumbuhan isolat bakteri proteolitik.



Gambar 4. Grafik pertumbuhan isolat bakteri A1 pada kultur pertumbuhan



Gambar 5. Grafik Pertumbuhan isolat bakteri A4 pada kultur pertumbuhan

Kesimpulan dan Saran

Terlihat pada Gambar 4 dan 5 grafik pertumbuhan isolat bakteri A1 dan A4 menunjukkan bahwa pertumbuhan optimum pada kedua isolat yang berbeda. Isolat A1 memiliki pertumbuhan optimum pada waktu ke-10 jam dibandingkan dengan pertumbuhan optimum isolat A4 terjadi pada waktu ke-4 jam. Fase optimum pada masing-masing Gambar 4 dan 5 (lingkaran warna merah pada gambar) kemudian diambil media kultur bakteri untuk diukur nilai aktivitas proteasenya yang kemudian akan dilihat nilai % transmittan dari masing-masing nilai sampel, nilai blanko dan nilai standart dari masing-masing kultur isolat bakteri (A1,A4).

Tabel 3. Nilai Unit Aktivitas Enzim Protease Isolat Bakteri Proteolitik Terpilih

Jenis Isol at	Nilai % Transmittan			Nilai Absorbansi 578 nm			Nilai Unit Aktivi tas Enzim
	Blan ko	Stand art	Sam pel	Blan ko	Stand art	Sam pel	
A1	100,0 %	7,6 %	98,9 %	0	1,12	0,005	0,0044
A4	100,0 %	4,1 %	62,0 %	0	1,388	0,208	0,1498

Keterangan : A = kode isolat bakteri asal sedimen

Nilai aktivitas enzim yang berbeda juga dipengaruhi beberapa faktor yang mempengaruhi kinerja isolat bakteri proteolitik dalam menghasilkan protease. Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh konsentrasi enzim dan konsentrasi substrat. Pengaruh aktivator, inhibitor dan kofaktor dalam beberapa keadaan juga merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim (Indah, 2004).

Menurut Judoamidjojo, dkk., (1990) diketahui pada fase eksponensial merupakan fase dimana pertumbuhan bakteri menjadi lebih cepat akan tetapi komposisi kimiawi media biakan berubah akibat sintesis produk dalam penggunaan substrat. Penggunaan substrat yang dibuat berasal dari sumber kasein. Sehingga tingginya laju pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial menyebabkan persaingan dalam mensintesis komponen substrat yang hanya berupa kasein didalam media biakan.

1. Isolasi bakteri dari saluran pembuangan asal limbah industri tahu yang ditumbuhkan pada media *Skim Milk Agar* diperoleh sebanyak 7 isolat bakteri proteolitik, masing-masing 4 isolat bakteri berasal dari sampel sedimen dan 3 isolat berasal dari sampel air.
2. Karakterisasi dari isolat bakteri proteolitik yang terlebih dahulu dilakukan seleksi, diperoleh 2 isolat bakteri proteolitik yang masing-masing memiliki Nilai Indeks Proteolitik tertinggi yaitu A1 (3,02 mm) dan A4 (2,90 mm). Karakterisasi morfologi sel yang meliputi pengecatan gram menunjukkan kedua isolat bakteri proteolitik A1 dan A4 termasuk dalam golongan bakteri basil gram positif. Pada pewarnaan spora menunjukkan kedua isolat bakteri A1 dan A4 tidak memiliki spora.
3. Hasil uji aktivitas protease pada kedua isolat bakteri terpilih A1 dan A4 didapatkan nilai aktivitas protease yaitu masing-masing A1 sebesar 0,044 U/mL dan A4 sebesar 0,1498 U/mL.

Saran

Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi isolat bakteri proteolitik yang telah didapatkan dari masing-masing sampel dan optimalisasi aktivitas enzim protease pada masing-masing isolat bakteri proteolitik terpilih dalam menghasilkan protease dalam jumlah besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Buckle, K.A, dkk., 2004. **Teknologi Fermentasi Susu**. Cetakan keempat. UI Press; Jakarta.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., dan Nitchel, L.G., 2003. **Biologi : Edisi kelima jilid 3**. Jakarta : Erlangga.
- Cappucino, A.H., Robert S., and Jenn M., 2001. **Ecologi of Prokarioty Microbes in the Guths of wood and Litter Pending Termites**. Didalam: Abe T, Bignell DE, Higashi M, editor. *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, Dordecht: Kluwer Academic.

- Droste, R.L. 1997. **Theory and Practice of Water and Wastewater Treatment**. USA: John Wiley and Sons, Inc.
- Durham, D. R., D. B. Stewart, and E. J. Stellwag. 1987. **Novel alkaline and heat stable serine proteases from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain GX6638**. *J. Bacterial.*, 169(6): 2762- 2768.
- Enggel J, Meriandini A dan NataliaL., 2004, **Karakterisasi Protease Ekstraseluler *Clostridium bifermentans* R14-1-b**, *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. **9(1)**: 9-12.
- Indah, A.N., 2004. **Karakterisasi Protease Dari Bakteri Patogen *Staphylococcus epidermis***. Jurnal Teknologi Pangan. No.3. Departemen Teknologi Pangan, Bogor.
- Wahjono dan Said K., 1999. **Teknologi Pengelohan Kedelai Menjadi Makanan Bermutu**. Jakarta, Pustaka Sinar Harapan.
- Yusriah dan Kuswyasari N.D., 2013. **Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium* sp.** Jurnal Sains dan Semi Pomits. Vol.2, No.1. Surabaya, Institut Teknologi Sepuluh November.